

FABIANA LIGIA LORA

**ESTUDO CLÍNICO, CITOGENÉTICO E MOLECULAR DA
SÍNDROME DO X FRÁGIL**

**Trabalho apresentado à Universidade
Federal de Santa Catarina, para a
conclusão do Curso de Graduação em
Medicina.**

FLORIANÓPOLIS – SANTA CATARINA

1999

FABIANA LIGIA LORA

**ESTUDO CLÍNICO, CITOGENÉTICO E MOLECULAR DA
SÍNDROME DO X FRÁGIL**

Trabalho apresentado à Universidade
Federal de Santa Catarina, para a
conclusão do Curso de Graduação em
Medicina.

Coordenador do curso: Prof. Dr. Edson Cardoso

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana Ternes Pereira

FLORIANÓPOLIS – SANTA CATARINA

1999

Lora, Fabiana Ligia.

Estudo clínico, citogenético e molecular da Síndrome do X Frágil./ Fabiana Ligia Lora --- Florianópolis, 1999.

67 p.

Trabalho apresentado à Universidade Federal de Santa Catarina, para a conclusão do Curso de Graduação em Medicina - UFSC

Título em inglês: Clinical, cytogenetic and molecular study of the Fragile X Syndrome.

1.Síndrome do X Frágil. 2.Gene FMR1. 3.Retardo mental. 4.FRAXA.

DEDICATÓRIA

**À família que pelo interesse e
disposição tornou possível a
realização deste trabalho.**

AGRADECIMENTOS

À Dra. Márcia Pimentel, Universidade Federal do Rio de Janeiro- Departamento de Biologia Celular e Genética, por ter realizado a análise molecular que foi fundamental para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, a maior de todas as gratidões. Muito obrigado por serem pessoas tão maravilhosas, terem acreditado nos meus sonhos e tornado possível sua realização e principalmente pelo amor e dedicação, que mesmo de longe, sempre foram imensos.

À Dra. Eliana Ternes Pereira, minha orientadora, pela amizade, idéia, entusiasmo, ensinamentos e, acima de tudo, por ser um exemplo de profissional de extrema dedicação e competência.

À Dra. Maria Verônica Muñoz Rojas, pela amizade e apoio.

Aos profissionais do laboratório de Genética do HU-UFSC, Márcio Bello Cordeiro e José Luís de Almeida, pela amizade e ajuda.

À Elaine Schoeffel, pela amizade e pelo empréstimo do computador, sobre o qual perdi muitas horas de sono, e que foi muito importante para a conclusão deste trabalho.

Aos amigos e colegas, de modo especial a Aniela e a Kika, que suportaram as frustrações e, junto comigo, festejarão a conclusão deste trabalho.

Ao meu amor, de modo especial, por toda paciência, pela ajuda em muitas partes deste trabalho, principalmente nas minhas desavenças com o computador, pelo carinho nas horas difíceis, pelo incentivo e pela alegria que traz à minha vida.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	09
1.1. HISTÓRICO.....	09
1.2. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	10
1.2.1. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS EM HOMENS.....	10
1.2.2. CARACTERÍSTICAS COGNITIVAS.....	12
1.2.3. CARACTERÍSTICAS COMPORTAMENTAIS.....	12
1.2.4. HETEROZIGOTAS.....	13
1.3. PADRÃO DE HERANÇA.....	14
1.4. CITOGENÉTICA.....	14
1.4.1. SÍTIOS FRÁGEIS.....	14
1.4.2. FATORES DE CULTURA.....	15
1.4.3. ANÁLISE CITOGENÉTICA.....	15
1.5. ESTUDOS MOLECULARES.....	16
1.5.1. O GENE FMR1.....	16
1.5.2. A PROTEÍNA FMRP.....	18
1.5.3. ESTUDOS MOLECULARES.....	19
2. OBJETIVOS.....	21
3. MÉTODOS.....	22
3.1. PACIENTES.....	22
3.2. PROCEDIMENTOS.....	22
3.2.1. HEREDOGRAMA E AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	22
3.2.2. AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA.....	22
3.2.3. ISOLAMENTO DO DNA.....	25
3.2.4. ANÁLISE DO DNA.....	26

4. RESULTADOS.....	27
4.1. HEREDOGRAMA.....	27
4.2. AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	27
4.2.1. PACIENTE III ₁₀	29
4.2.2. PACIENTE III ₁₁	32
4.2.3. PACIENTE III ₁₅	35
4.2.4. PACIENTE III ₁₆	38
4.2.5. PACIENTE III ₁₈	40
4.3. ANÁLISE CITOGENÉTICA.....	41
4.4. ANÁLISE MOLECULAR.....	43
5.DISCUSSÃO.....	44
5.1. HEREDOGRAMA.....	44
5.2. CLÍNICA.....	45
5.2.1. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS NOS HOMENS.....	45
5.2.2. CARACTERÍSTICAS COGNITIVAS.....	47
5.2.3. CARACTERÍSTICAS COMPORTAMENTAIS.....	47
5.2.4. HETEROZIGOTAS.....	48
5.3. ANÁLISE CITOGENÉTICA.....	49
5.4. ANÁLISE MOLECULAR.....	51
6. CONCLUSÕES.....	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
8. RESUMO.....	65
9. SUMMARY.....	66
10. APÊNDICE.....	67

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Expansão da premutação na transmissão materna.....	17
FIGURA 2. Heredograma.....	28
FIGURA 3. O paciente III ₁₀	30
FIGURA 4. Mãos do paciente III ₁₀	31
FIGURA 5. Pés do paciente III ₁₀	31
FIGURA 6. O paciente III ₁₁	33
FIGURA 7. Mãos do paciente III ₁₁	34
FIGURA 8. Pés do paciente III ₁₁	34
FIGURA 9. O paciente III ₁₅	36
FIGURA 10. Mãos do paciente III ₁₅	37
FIGURA 11. Pés do paciente III ₁₅	37
FIGURA 12. As pacientes III ₁₆ e III ₁₈	39
FIGURA 13. A paciente III ₁₆	39
FIGURA 14. A paciente III ₁₈	41
FIGURA 15. Sítio frágil do cromossomo X – coloração convencional.....	42
FIGURA 16. Sítio frágil Xq27.3 – bandeamento GTG.....	42
FIGURA 17. Representação esquemática dos fragmentos de restrição normal e mutado detectados pela sonda StB12.3.....	52

LISTA DE TABELAS

TABELA I. Relação entre premutação e mutação do gene FMR1 e metilação no cromossomo	53
---	----

1.INTRODUÇÃO

O retardo mental ligado ao sexo pode ser determinado por diversos genes já conhecidos, localizados no cromossomo X. Entre os quais, o responsável pela Síndrome do X Frágil ou FRAXA (Fu et al., Oberlé et al. e Vervek et al.)^{1,2,3}, reconhecida pela detecção de um sítio frágil folato sensível no exame citogenético. Outras condições caracterizadas pela detecção de sítios frágeis folato sensíveis são: FRAXE (Sutherland et al.)⁴, FRAXD E FRAXF (Hirst et al.)⁵. A mais comum e conhecida delas é a FRAXA, associada ao sítio frágil Xq27.3.⁶, que representa uma síndrome de repetição do trinucleotídeo CGG³.

FRAXA é a forma mais comum de deficiência mental (DM) herdada correspondendo a aproximadamente 25% a 50% dos casos de retardo mental ligado ao cromossomo X^{6,7}. A prevalência desta patologia é de 1 em 1100 a 1250 homens e 1 em 2000 a 2500 mulheres. Cerca de 1 em cada 700 mulheres são carreadoras da doença. É a segunda causa mais freqüente de deficiência mental, após a Síndrome de Down⁸.

Esta síndrome é caracterizada por deficiência mental, macroorquidia, face longa, orelhas grandes e proeminentes.^{6,9}

1.1.Histórico

Desde o século XVII é reconhecida uma maior incidência de deficiência mental nos indivíduos do sexo masculino que nos do sexo feminino. Em 1943, Martin e Bell descreveram pela primeira vez, dentro de uma família que possuía 11 homens afetados, uma forma de deficiência mental ligada ao sexo, sugerindo

já naquela data, que doenças ligadas ao cromossomo X seriam as responsáveis pelo maior número de homens com deficiência mental.^{4, 10}

Em 1969, 26 anos após a observação de Martin e Bell, Herbert Lubs mostrou a existência de um sítio frágil no cromossomo X, representado por uma constricção na região Xq27.3, em quatro homens com deficiência mental e em duas mulheres normais, pertencentes a três gerações de uma mesma família. Após este achado, ocorreram poucos relatos esporádicos da existência desse cromossomo X marcador¹¹. Em 1979, Sutherland¹², demonstrou que a expressão do sítio frágil em linfócitos do sangue periférico era dependente de um meio de cultura pobre em folato e timidina. Desde então, a Síndrome do X Frágil passou a ser diagnosticada pela detecção citogenética do sítio frágil Xq27.3. Em 1991, foi identificado o gene envolvido com a doença, o FMR1 (Fragile X Mental Retardation 1) por três grupos isoladamente (Fu et al., Oberlé et al. e Vervek et al.)^{1,2,3}. Atualmente grande parte dos diagnósticos são realizados por meio de estudos moleculares.

1.2. Manifestações Clínicas

As características fenotípicas da Síndrome do X Frágil são encontradas em homens e mulheres, porém de formas muito variáveis, refletindo a variabilidade de expressão da mutação. Não existe uma característica que seja encontrada em 100% dos afetados, ou que seja patognomônica desta patologia¹³.

1.2.1. Características fenotípicas em homens

As características clássicas desta doença são três: macroorquidismo,

orelhas grandes e proeminentes e face estreita e alongada ⁴.

Craniofaciais: A circunferência craniana pode ser desproporcionalmente grande em correlação com o peso e a estatura do paciente^{8,9}. É comum a testa ampla em formato quadrangular e face longa com queixo proeminente. As orelhas têm forma normal, porém geralmente são grandes e proeminentes e em adultos raramente medem menos do que 6 cm de comprimento. As regiões supra-orbitárias são proeminentes, a fissura palpebral possui comprimento normal, mas pequenos epicantos são encontrados freqüentemente. Os olhos não apresentam malformações mas pode ocorrer estrabismo e miopia ou hipermetropia. A ponte nasal geralmente é alargada. O palato pode ser ogival, o filtrum longo e, geralmente, o lábio superior apresenta-se mais fino que o inferior^{6,8, 14}

Tecido conjuntivo: Existe uma displasia relacionada a forma e número de fibrilas da elastina ⁶.

- Pele: é macia e lisa, principalmente nas crianças;⁸
- Articulações: são hiperextensíveis e amplas, porém as luxações não são comuns. O pé pode ser plano (40% dos pacientes) ou equinovaro;^{8,15}
- Achados cardiológicos: aproximadamente 80% dos hemizigotos apresentam prolapso de valva mitral, e em torno de 15% dos casos, também pode ocorrer dilatação aórtica.^{14,16}

Sistema genitourinário: o macroorquidismo, que corresponde a um volume testicular acima de 25 ml em homens adultos, é uma das características fenotípicas clássicas da Síndrome do X Frágil. Este aumento de volume pode ser uni ou bilateral, e é principalmente observado após a puberdade, quando está presente em aproximadamente 75% dos pacientes, em comparação com 40% dos indivíduos pré-púberais⁹. Também tem sido notado em mais de 50% dos afetados adultos hiperpigmentação da bolsa escrotal e alargamento peniano.⁸

1.2.2.Características cognitivas

Os déficits intelectuais na Síndrome do X Frágil são muito variáveis, podem apresentar-se apenas como uma dificuldade de aprendizado com um QI normal até uma deficiência mental severa.^{6,13}

Existe um declínio da função cognitiva e déficit da atenção com a idade, geralmente indivíduos pré-púberais têm um déficit intelectual leve enquanto homens adolescentes e adultos apresentam uma deficiência mental moderada a severa.¹⁷

1.2.3.Características comportamentais

As características comportamentais podem ajudar no reconhecimento da síndrome, principalmente em pacientes pré-púberais, os quais geralmente não apresentam muitas das características fenotípicas comuns da doença⁶.

Os problemas de comportamento podem apresentar grande variabilidade, ocorrendo desde pequenas dificuldades de relacionamento interpessoal até o autismo clássico, que é observado em 15% dos casos, e ao qual esta doença tem sido associada desde 1982. Tal associação tem ocorrido devido a determinadas características apresentadas principalmente por pacientes pré-púberais, tais como pobre contato visual ou aversão a este, maneirismo de mãos ou movimentos estereotipados e repetitivos, dificuldade e atraso na fala e na linguagem, fala persistente e repetitiva (ecolalia), além de déficit de atenção e dificuldade de concentração^{18,19}. Estes indivíduos também podem ser hiperativos, o que tende a desaparecer após a puberdade e podem ainda apresentar instabilidade emocional, agressividade, em até 50% dos afetados, e automutilação.^{6,14}

Alguns autores acreditam que as duas doenças, Autismo e Síndrome do X Frágil, tenham uma patogênese semelhante, sendo que na última primeiro ocorreria uma aversão social e secundariamente apareceria o autismo clássico, porém tudo ainda é muito controverso.¹⁹

1.2.4.Heterozigotas

O grau de envolvimento em mulheres carreadoras é bastante variável. Elas podem ser desde completamente normais até apresentar uma deficiência mental severa. Estima-se que apenas 30% a 35% das heterozigotas são afetadas cognitivamente, com QI intermediário ou baixo, e que 15% apresentam dificuldade no aprendizado^{6,8,14}. Das que têm a mutação completa, 71% apresentam QI abaixo de 85⁷. Admite-se que o número de repetições do trinucleotídeo CGG da mutação é o fator que exerce maior influência no grau cognitivo destas mulheres²⁰.

As características fenotípicas, quando presentes podem ser semelhantes as masculinas, como mandíbula protusa, face estreita e alongada, orelhas grandes e testa proeminente. A expressão fenotípica tende a ser mais comum naquelas mulheres também afetadas cognitivamente⁶.

A falência ovariana prematura (FOP) é outra característica clínica que tem sido descrita em mulheres portadoras da premutação do gene FMR1. Em 1998, um estudo confirmou a associação de premutações do gene da Síndrome do X Frágil com FOP²¹, demonstrou que 16% das mulheres com história de FOP familiar carregam premutações.

A fertilidade das mulheres carreadoras pode ser maior que a da população normal, com frequência maior de gestações gemelares e de abortos espontâneos^{14,22}.

1.3. Padrão de herança

A Síndrome do X Frágil é uma doença ligada ao X com penetrância incompleta em homens e mulheres¹³.

Vários estudos demonstraram que cerca de 20% dos homens de famílias com a síndrome são carreadores da mutação sem apresentar manifestações clínicas ou intelectuais. Admite-se que a expressão fenotípica depende da posição do indivíduo no heredograma, sendo que a expressão da doença é maior nas gerações mais novas, ou seja, os portadores não penetrantes são preferencialmente encontrados nas gerações mais velhas. O grau de deficiência mental também é maior nos descendentes de mulheres afetadas do que em filhos de mulheres carreadoras normais. Este fenômeno é conhecido como o Paradoxo de Sherman, e pode ser explicado através da existência de expansão das repetições do trinucleotídeo CGG, que varia em tamanho entre os vários indivíduos de uma mesma família^{8,23}.

1.4. Citogenética

1.4.1. Sítios Frágeis

Os sítios frágeis nos cromossomos humanos podem ser definidos como regiões vulneráveis do DNA, onde ocorrem lesões espontâneas ou induzidas por determinados agentes. Eles aparecem como regiões não coradas, de largura variável que atingem geralmente ambas as cromátides.²⁴

Muitos relatos indicam que os sítios frágeis são a manifestação de uma alteração na atividade genética de locais associados com a regulação da

transcrição. Eles podem ser responsáveis por doenças assim como podem ser apenas uma diversificação genética, sem manifestações importantes.^{24,25}

1.4.2.Fatores de cultura

O sítio frágil da Síndrome do X Frágil foi descrito pela primeira vez por Lubs em 1969, mas só em 1979, Sutherland descobriu que certos meios de cultura favorecem o aparecimento deste sítio.

Sutherland demonstrou que a redução de ácido fólico e timidina no meio de cultura ou a adição metotrexato (inibidor da síntese do folato) no meio, favorece o aparecimento deste sítio¹².

A substância 5-fluorodeoxiuridina (FUdR) é um potente indutor da expressão do sítio frágil por inibir a enzima timidilato sintetase (catalisadora da síntese da timidina monofosfato).¹²

O pH do meio em torno de 7 a 8 aumenta a detecção dos sítios frágeis, assim como o aumento do tempo de cultura de 72 para 96 horas, porém não mais do que isto, pois após 5 dias de cultura a sua demonstração diminui.^{26,27}

Um melhor crescimento das células em cultura é também favorecido com acréscimo de soro e de uma estocagem por períodos relativamente curtos de tempo, pois quando a amostra do sangue é estocada por muitos dias os resultados são prejudicados^{12,14}.

1.4.3.Análise citogenética

O protocolo mais aceito analisa 100 metafases de cultura deficiente em ácido fólico e considera o diagnóstico positivo se pelo menos 4% apresentarem o sítio frágil Xq27.3. Quando a frequência for inferior a 4%, o exame deve ser repetido em uma nova amostra de sangue¹⁴. No caso de não haver aumento do número de

cromossomos X com sítio frágil e de ser mantida a suspeita clínica é indicado o estudo molecular.

Das mulheres que são carreadoras obrigatórias, apenas 50% apresentam o sítio frágil em 3% de suas células¹⁴. Existem ainda evidências de que a expressão da fragilidade do cromossomo X decresce com a idade, tornando o diagnóstico pela análise citogenética dificultado após os 25 anos em heterozigotas²⁸.

1.5.Estudos Moleculares

1.5.1.O Gene FMR1

O FMR1 é um gene de 38 Kb de extensão que possui 17 éxons, sendo o RNA transcrito, de 4,4 Kb. No primeiro éxon existe uma região polimórfica com repetição do trinucleotídeo CGG, que quando sofre alteração de tamanho causa alteração na função do gene. Esta repetição se localiza dentro da região 5' não traduzida do gene. Na população normal a repetição pode variar de 6 a 54 unidades, sendo que o alelo mais encontrado tem 29 a 30 repetições^{1,10,13,29}. Esta região pode apresentar, em algumas pessoas, um processo denominado de amplificação, o qual causa expansão do número das repetições podendo levar a uma mutação no gene FMR1.(Figura 1)

Expansões pequenas na região polimórfica, com o número de repetições ficando entre 54 e 200 cópias CGG, são denominadas de Premutações³⁰. Estas não aparecem nos estudos citogenéticos e podem ser observadas em homens e mulheres normais transmissores da doença. A incidência de premutação na população geral é alta, o que talvez possa explicar a alta incidência da doença pois os pacientes com a síndrome têm fertilidade menor que o normal³¹.

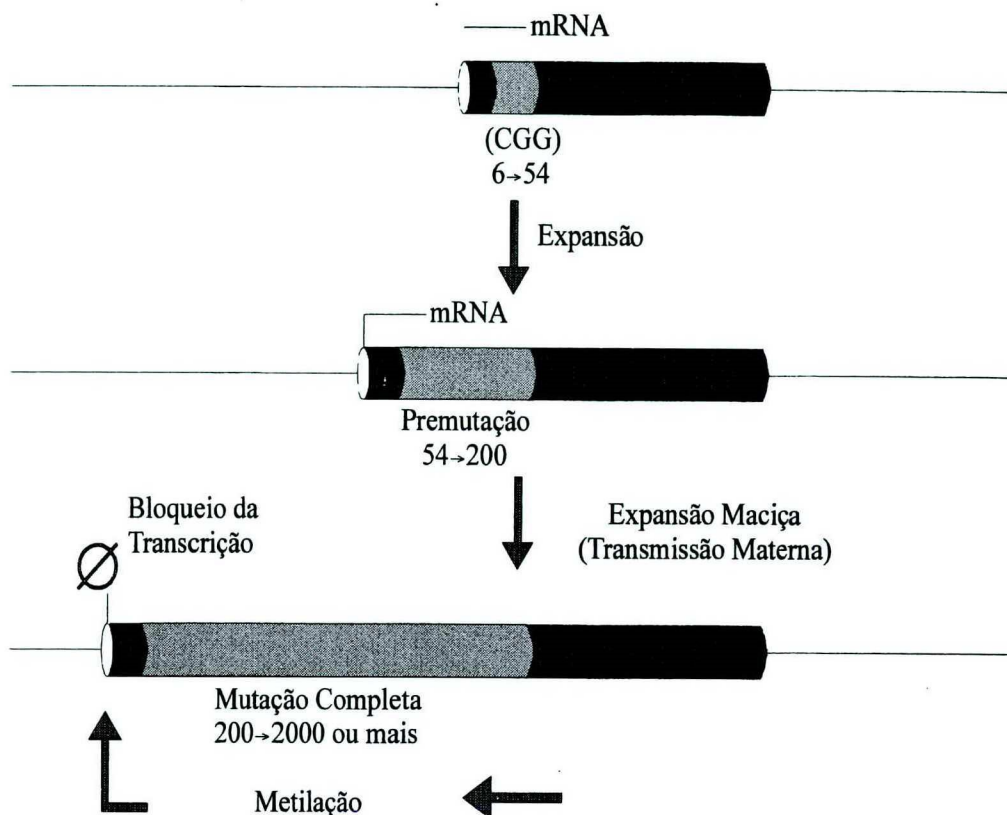


FIGURA 1 – Expansão da premutação na transmissão materna

A figura 1 representa os eventos moleculares que podem ocorrer na região CGG repetitiva em Xq27.3.

A premutação é instável e tende a sofrer nova expansão, mais comum na gametogênese feminina, que durante a espermatogênese de um portador normal da premutação. Admite-se que haja a seleção negativa dos espermatozoides com o gene mutante. Um homem portador da premutação pode ter netos afetados, mas não filhos, pois nas filhas carreadoras o gene premutado pode sofrer nova expansão, originando uma mutação completa acima de 200 repetições CGG, durante a gametogênese³².

Quando a amplificação origina uma sequência com mais de 200 cópias CGG repetidas, denomina-se então de Mutação Completa. A expansão para tal

mutação é normalmente acompanhada por uma hipermetilação da repetição e de uma “ilha CpG” (região de alta densidade de dinucleotídeos citidina fosfato guanossin) localizada na região promotora do gene FMR1, resultando em parada da transcrição e ausência da proteína produzida por este gene.² Todos os homens e a maioria das mulheres que possuem a mutação completa são afetados, ou seja, são mentalmente deficientes.^{10,13}

Outras formas de mutações do gene FMR1, como deleções ou mutações em ponto têm sido raramente identificadas, não sendo causas comuns da Síndrome do X Frágil.³³

1.5.2.A Proteína FMRP

A transcrição do gene FMR1 inicia distalmente a região da repetição do trinucleotídeo CGG e dá origem a uma proteína de 70-80 Kda, chamada FMRP. Esta transcrição ocorre de forma igual tanto nas células de indivíduos normais quanto nas de portadores do alelo premutado e origina níveis iguais de proteína.^{32,33}

Estudos de hibridização “in situ” e imunohistoquímica mostraram que muitos tecidos expressam a proteína, particularmente o cérebro e os testículos. No cérebro normal é encontrada nos neurônios e está ausente ou em pequena quantidade nas células não neuronais. Nos testículos é encontrada nos túbulos seminíferos e, tanto as células germinativas primordiais (pré-natal) quanto as espermatogônias (pós-natal) apresentam grande expressão da FMRP. Esta localização é compatível com o fenótipo clínico da síndrome, representado principalmente por déficit cognitivo e macroorquidismo. Outras células que também expressam a FMRP são as presentes no tecido cardíaco, linfóide e tecido de cicatrização.^{33,34}

A localização predominante da FMRP é o citoplasma mas também é encontrada no núcleo. O éxon 14 parece codificar um peptídeo sinal que está envolvido com a exportação nuclear da proteína, pois investigações mostraram que a expressão do FMR1 sem este éxon fica limitada ao núcleo.³⁵

A FMRP tem tido sua função relacionada ao metabolismo do RNA sugerindo uma atuação na função ribossômica e na tradução de certas proteínas, o que pode ser explicado pela alta expressão da FMRP em alguns tecidos que apresentam ativa divisão como os tecidos em cicatrização^{10,33}.

1.5.3. Estudos Moleculares

Atualmente o melhor diagnóstico da Síndrome do X Frágil é a determinação do número da amplificação da repetição CGG, tanto para os indivíduos afetados quanto para os carreadores.

Os métodos mais usados são Southern blotting e PCR (reação de cadeia de polimerase). O primeiro é o melhor método para detecção de repetições amplificadas acima de 200. Para sua realização podem ser utilizadas diferentes enzimas de restrição tais como HindIII, BglII, PstI. Também pode-se utilizar uma dupla digestão enzimática (EcoRI e EagI), onde uma das enzimas de restrição é metilação sensível e serve para a identificação do estado de metilação do gene.^{10,36}

O PCR é um método alternativo, que pode ser útil para a caracterizar até 150 repetições e determinar os alelos normais presentes. Entretanto, repetições acima de 150 unidades geralmente dificultam a amplificação pelo PCR, não produzindo um produto detectável. Por esta razão a análise do produto do PCR é um teste que pode ser utilizado para a detecção de premutações no FMR1, mas não identifica a mutação.^{10,13}

Os métodos descritos podem identificar o tamanho da amplificação da repetição CGG e deleções grandes no FMR1, porém outras mutações como pequenas deleções ou mutações em ponto não são detectadas.¹⁰

Um teste imunológico, baseado na detecção da proteína do gene FMR1 em linfócitos do sangue periférico, bastante sensível para detecção de homens afetados, também foi desenvolvido. Entretanto este serve apenas como teste para triagem e não como teste diagnóstico e deve ser confirmado por meio de Southern blotting. Este teste pode ser usado como primeiro método de triagem para o diagnóstico da Síndrome do X Frágil de homens em instituições especializadas para deficientes mentais.³⁷

2.OBJETIVOS

1. Demonstrar a expressão fenotípica da Síndrome do X Frágil em uma família.
2. Estudar a variação da sequência de trinucleotídeos CGG em uma família com a Síndrome do X Frágil e correlacionar com os achados clínicos e citogenéticos.

3.MÉTODOS

3.1.Pacientes

Foi estudada uma família portadora da Síndrome do X Frágil atendida desde o ano de 1986 no ambulatório de Genética do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, na cidade de Florianópolis.

3.2.Procedimentos

3.2.1.Heredograma e avaliação clínica

Inicialmente foi feita uma história clínica da família e montado o heredograma da mesma, identificando os indivíduos com risco de serem afetados ou portadores da Síndrome do X Frágil. Foi realizado o exame físico das pessoas identificadas pelo heredograma e realizado o preenchimento de uma ficha com as características clínicas mais comuns da doença, para detecção de fenótipo sugestivo da Síndrome do X Frágil.

3.2.2.Avaliação citogenética

Os exames citogenéticos dos pacientes II-11, III-4, III-10, III-11, III-12, III-14, III-15, III-16, III-17, III-18 (figura 2) foram realizados no laboratório de Citogenética do HU-UFSC, seguindo o procedimento descrito abaixo.

Foram colhidos 5 ml de sangue periférico de cada paciente em seringa heparinizada.

Implante das culturas:

- Centrifugado o sangue por 8 minutos a 1000 rpm;
- Em câmara asséptica, com pipetas Pasteur, coletada a camada de leucócitos e implantada em 2 frascos com 8 ml do meio de cultura;
- Incubadas as culturas a 37°C por 96 horas;
- Adicionado 0,1 ml da solução de FUdR à cada cultura nas 72 horas;
- Colocado 0,2 ml de colchicina em cada frasco de cultura nas 94 horas;
- Fixadas as culturas nas 96 horas.

Soluções para cultura:

Meio de cultura:

Meio RPMI 1640.....7,2ml

Soro bovino fetal.....0,8ml

Fitohemaglutinina.....0,1ml

Solução de estoque de FUdR:

FUdR.....0,1mg

Água destilada.....1ml

Fixação das culturas:

- Centrifugadas as culturas a 1500 rpm por 10 minutos;
- Desprezado o sobrenadante em solução de hipoclorito de sódio;
- Adicionado 4 ml de solução hipotônica (KCl 0,075M);
- Colocado o material por 10 minutos na estufa a 37°C;
- Repetida a centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos;
- Desprezado o sobrenadante em solução de hipoclorito de sódio;

- Deixado o material por 35 minutos a temperatura ambiente;
- Centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm;
- Desprezado o sobrenadante em solução de hipoclorito de sódio;
- Adicionadas algumas gotas da solução metanol acético ao material;
- Ressuspendido o material;
- Feitas lâminas colocando 3 a 4 gotas do material em cada lâmina;
- Coradas as lâminas com Giemsa 2% (coloração convencional).

Soluções para fixação:

Solução metanol acético:

Metanol 3: 1 Ácido acético

Solução de Carnoy:

Álcool etílico.....30 ml

Clorofórmio.....15 ml

Ácido acético.....5 ml

Análise do material:

- Foram analisadas 100 metáfases com coloração convencional;
- As lâminas então foram descoradas com álcool etílico;
- Foi realizado bandeamento das lâminas (banda GTG) com tripsina;
- As metáfases com X frágil com banda GTG foram reavaliadas.

3.2.3. Isolamento do DNA

O isolamento de DNA do sangue periférico dos pacientes II₁₁, II₁₂, III₄, III₁₀, III₁₁, III₁₂, III₁₄, III₁₅, III₁₆, III₁₇, III₁₈ do heredograma da Figura 2 foi realizado no laboratório de Citogenética do HU-UFSC.

Foram colhidos 20 ml de sangue periférico de cada paciente em tubo de ensaio com EDTA. O procedimento descrito abaixo foi utilizado para cada 10 ml de sangue:

- Homogeneizado o sangue colhido;
- Diluído em 35 ml de tampão de lise do sangue (15 mM NH₄Cl, 10 mM NHCO₃, 1 mM EDTA pH 7,4) em tubo de 50 ml;
- Esperados 5 minutos em temperatura ambiente para ocorrer a lise das hemácias;
- Centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos;
- Desprezado o sobrenadante em solução de hipoclorito de sódio;
- Lavado o tubo com 10 ml de tampão de lise do sangue;
- Centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos;
- Desprezados o sobrenadante em solução de hipoclorito de sódio;
- Ressuspenso o sedimento com 3 ml de tampão de lise nuclear (10 mM Tris.Cl, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8,2);
- Adicionado 100 ul de pronase;
- Agitado o tubo levemente;
- Adicionado 150 ul de SDS 20%;
- Agitado o tubo levemente;
- Incubado a 37°C por 48 horas;
- Adicionado 1 ml de NaCl saturado (6 M);
- Agitado vigorosamente por 15 segundos;

- Centrifugado a 2500 rpm por 15 minutos;
- Transferido o sobrenadante para outro tubo;
- Repetida a centrifugação enquanto o sobrenadante esteve turvo;
- Precipitado o DNA adicionado 2 volumes de etanol absoluto a temperatura ambiente;
- Precipitado o DNA por 3 vezes para retirar o excesso de sal;
- Dissolvido o DNA em 400 μ l a 1000 μ l de TE-4 ;
- Incubado a 65°C por 30 minutos para evitar contaminação com DNase.

3.2.4. Análise do DNA

A metodologia da análise molecular foi realizada com o seguinte protocolo:

- DNA genômico foi digerido com as enzimas de restrição EcoRI e EagI com um tampão contendo 20mM de cloreto de magnésio
- A eletroforese dos fragmentos foi realizada em gel de agarose a 0.8%
- Os fragmentos foram fixados em filtro Hybond N+ (Amersham).
- A hibridização foi realizada com a sonda StB12.3 marcada com ^{32}P
- Os filtros foram lavados com solução salina (citrato de sódio 0.5x, SDS 0.1%, a 60° C)
- As placas de autorradiografia foram deixadas a -70° C por 3 dias
- Os filmes foram revelados com reagentes Kodak

Os resultados foram avaliados considerando que os sítios metilados não são cortados pela EagI

A sonda StB12.3 hibridiza com uma região adjacente a um fragmento de 200 bp na região Xq27.3 rica em dinucleotídeos CpG, suscetível a metilação ("ilhas CpG").

4.RESULTADOS

A família estudada no ambulatório era constituída por indivíduos do sexo masculino afetados e não afetados, e mulheres carreadoras obrigatórias da mutação e em de risco de possuírem a premutação ou mutação completa.. Todos foram atendidos no ambulatório do Núcleo de Genética clínica do HU-UFSC.

4.1.Heredograma

O heredograma da Figura 2 demonstra que haviam 4 homens com fenótipo da Síndrome do X Frágil. Destes, 3 eram filhos de uma mulher que também tinha dois filhos normais, duas filhas com dificuldade de aprendizagem e uma filha normal. O outro paciente da mesma família com o fenótipo da síndrome era filho da outra irmã que possuía 1 filho normal e 3 filhas normais.

O estudo citogenético foi realizado nos indivíduos II₇, II₁₁, III₄, III₁₀, III₁₁, III₁₄, III₁₅, III₁₆, III₁₈. O DNA foi isolado de II₁₁, II₁₂, III₁₀, III₁₁, III₁₂, III₁₄, III₁₅, III₁₆, III₁₇ e III₁₈.

4.2.Avaliação Clínica

A família foi reavaliada para este trabalho e só serão descritos os pacientes para os quais obtivemos os dados atuais da anamnese e do exame físico e que eram afetados ou de risco para FRAXA.

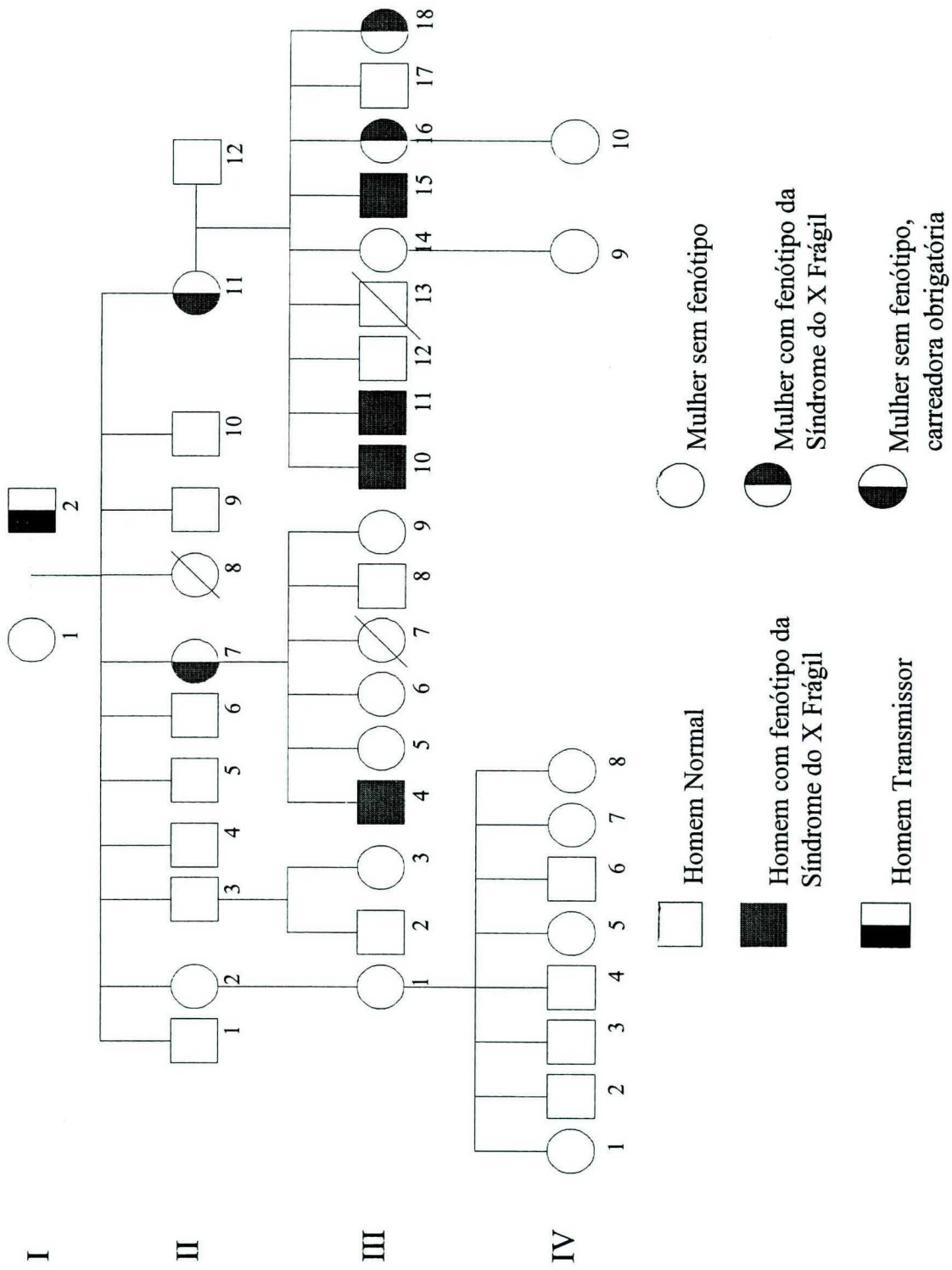


FIGURA - 2 - Heredograma

4.2.1.Paciente III₁₀

D.Z., 44 anos em setembro de 1999, masculino, branco, natural de Rancho Queimado (SC), procedente de Florianópolis (SC).(Figura 3) Informante: a irmã III₁₄ que referia como queixa principal “retardo mental”. A deficiência mental foi observada desde a infância com déficit de aprendizagem escolar, não conseguiu ler nem escrever; foi acompanhado por um breve período na APAE e, desde então tem acompanhamento em escola especial (Fundação Catarinense de Ensino Especial). Referia também que o paciente era bastante agitado e por vezes agressivo. Na investigação dos diversos aparelhos e sistemas relatava episódios esporádicos de dor precordial. Em relação ao período gestacional negava intercorrências. O parto foi normal, a termo, domiciliar. Apresentou cianose importante ao nascimento, mas não precisou de atendimento hospitalar. No período neonatal apresentou bom ganho pômdero estatural. Não sabia informar sobre o desenvolvimento neuropsicomotor, apenas que o paciente caminhou com 1 ano e 4 meses. Foi medicado com complexo vitamínico a base de fósforo por toda infância. Os antecedentes patológicos incluíam parotidite e varicela.

Apresentava as seguintes medidas antropométricas:

Peso: 80 kg

Estatura: 166 cm

Envergadura: 167 cm

Distância pube-pé: 87 cm

Perímetro cefálico: 57 cm

Ao exame físico apresentava:

- Geral: bom estado, hidratado, corado, anictérico, acianótico, eupneico, lúcido, contactuante.

- Segmento cefálico: face estreitada e alongada, fronte ampla e quadrangular, proeminência supraorbitária, estrabismo convergente, nariz com base alargada, pavilhão auricular medindo 8 cm com lóbulo proeminente, queixo alargado e palato ogival.
- Tórax: ausculta pulmonar normal. Na ausculta cardíaca apresentava um sopro sistólico ++/6. Avaliação do cardiologista não detectou doença orgânica.
- Abdome: sem alterações.
- Membros: pulsos palpáveis, boa perfusão. Dedos dos pés e mãos grossos e primeiro pododáctilo longo. Ausência de pé plano.(Figuras 4 e 5)
- Genitália: masculina, com macroorquidismo (volume testicular = 35 ml).
- Pele: fina
- Neurológico: comportamento infantil, fala confusa, discurso repetitivo, instabilidade emocional, agressividade moderada, reacional, marcha com base alargada, desajeitada, coordenação motora regular, reflexos tendinosos profundos aumentados.

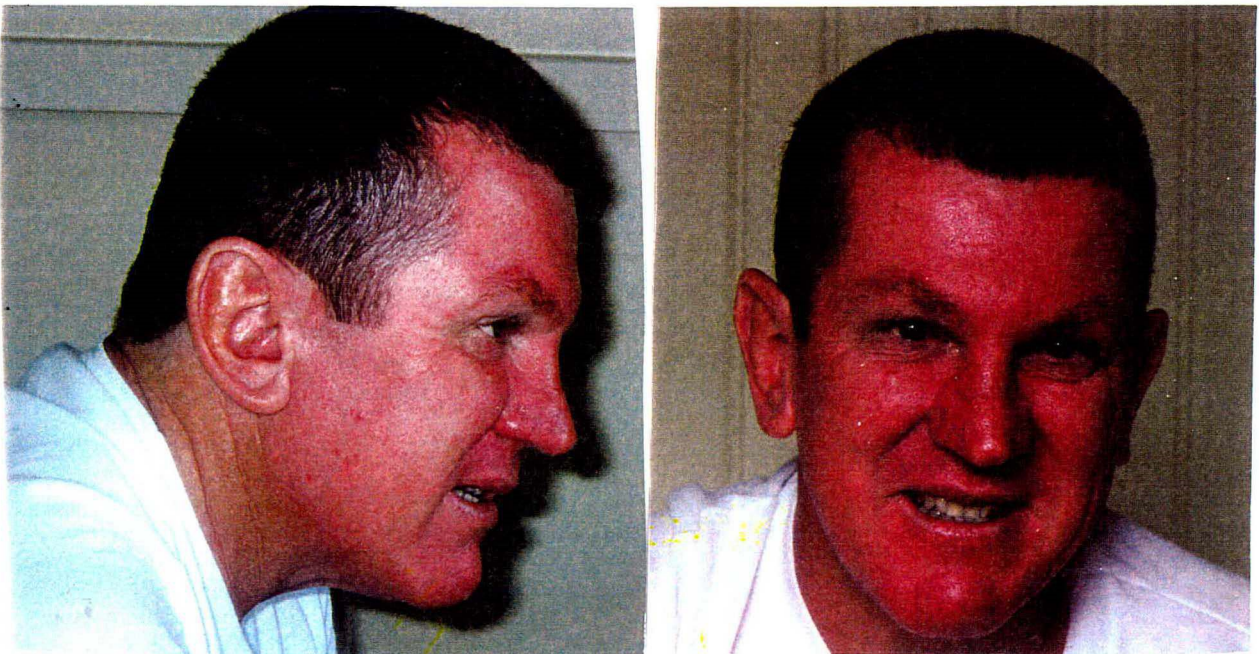


FIGURA 3 – O paciente III₁₀



FIGURA 4: Mãos do paciente III₁₀



FIGURA 5: Pés do paciente III₁₀

4.2.2. Paciente III₁₁

P.Z., 42 anos em setembro de 1999, masculino, branco, natural de Rancho Queimado (SC), procedente de Florianópolis (SC), sem internações anteriores (Figura 6). Informante: a irmã III₁₄. Tinha como queixa principal o “retardo mental”. Referia que desde o nascimento o paciente apresentava diferença de comportamento, era mais introvertido, em comparação aos outros irmãos. Não aprendeu a ler nem escrever, foi acompanhado por breve período na APAE e, desde então faz acompanhamento em escola especial (Fundação Catarinense de Ensino Especial). Melhorou muito o relacionamento interpessoal com o passar dos anos. Na investigação dos diversos aparelhos e sistemas não apresentava outras queixas. Sobre o período gestacional negava problemas. O parto foi normal, a termo, domiciliar, sem intercorrências. No período neonatal não apresentou doenças nem qualquer outra complicação, teve bom ganho pômdero estatural. Não sabia referir sobre desenvolvimento neuropsicomotor. Foi medicado com complexo vitamínico a base de fósforo por toda infância. Como antecedentes patológicos referia parotidite, varicela e meningite (aos 7 anos).

Medidas antropométricas:

Peso: 75 kg

Estatura: 162 cm

Envergadura: 164 cm

Distância pube-pé: 87 cm

Perímetro cefálico: 57 cm

Ao exame físico apresentava:

- Geral: bom estado, hidratado, corado, anictérico, acianótico, eupneico, lúcido, contactuante.

- Segmento cefálico: face estreitada e alongada, fronte ampla e quadrangular, nariz com base alargada, pavilhão auricular medindo 7 cm com lóbulo proeminente, queixo alargado.
- Tórax: ausculta pulmonar e cardíaca normais.
- Abdome: sem alterações.
- Membros: pulsos palpáveis, boa perfusão. Dedos dos pés e mãos grossos e primeiro pododáctilo longo. Ausência de pé plano.(Figuras 7 e 8)
- Genitália: masculina, com macroorquidismo (volume testicular = 50 ml).
- Pele: fina
- Neurológico: comportamento infantil, fala embaralhada, agressividade leve, reacional, marcha com base alargada, desajeitada, boa coordenação motora, reflexos tendinosos profundos aumentados.



FIGURA 6: O paciente III₁₁



FIGURA 7: Mãos do paciente III₁₁



FIGURA 8: Pés do paciente III₁₁

4.2.3. Paciente III₁₅

P.Z., 35 anos em setembro de 1999, masculino, branco, natural de Rancho Queimado (SC), procedente de Florianópolis (SC), sem internações anteriores. (Figura 9) Informante: a irmã III₁₄. Sua queixa principal era “retardo mental”. Foi observada deficiência mental desde a infância, na escola nunca conseguiu acompanhar os colegas, não aprendeu a ler nem a escrever. Foi acompanhado na APAE por breve período e, desde então faz acompanhamento em escola especial (Fundação Catarinense de Ensino Especial). Na investigação dos diversos aparelhos e sistemas referia dificuldade visual. No período gestacional não ocorreram intercorrências. Nasceu de parto normal, a termo, domiciliar, sem complicações. No período neonatal apresentou bom ganho pômdero estatural, não sabia referir sobre problemas. Sobre o desenvolvimento neuropsicomotor não sabia dar informações, só que controlou os esfínteres apenas aos 7 anos de idade. Como antecedentes patológicos referia parotidite e varicela.

Medidas antropométricas:

Peso: 87 kg

Estatuta: 176 cm

Envergadura: 175 cm

Distância pube-pé: 91 cm

Perímetro cefálico: 61 cm

Ao exame físico apresentava:

- Geral: bom estado, hidratado, corado, anictérico, acianótico, eupneico, lúcido, contactuante.
- Segmento cefálico: face estreitada e alongada, fronte ampla e quadrangular, proeminência supraorbitária, nariz com base alargada, pavilhão auricular

proeminente medindo 7 cm com lóbulo saliente, queixo alargado, mandíbula proeminente, palato ogival.

- Tórax: ausculta pulmonar e cardíaca normais.
- Abdome: sem alterações.
- Membros: pulsos palpáveis, boa perfusão. Dedos dos pés e mãos grossos e primeiro pododáctilo longo. Ausência de pé plano.(Figuras 10 e 11)
- Genitália: masculina, com macroorquidismo (volume testicular = 40 ml).
- Pele: fina.
- Neurológico: comportamento infantil, fala embaralhada, agressividade leve, reacional, marcha com base alargada, desajeitada, boa coordenação motora, reflexos tendinosos profundos aumentados.

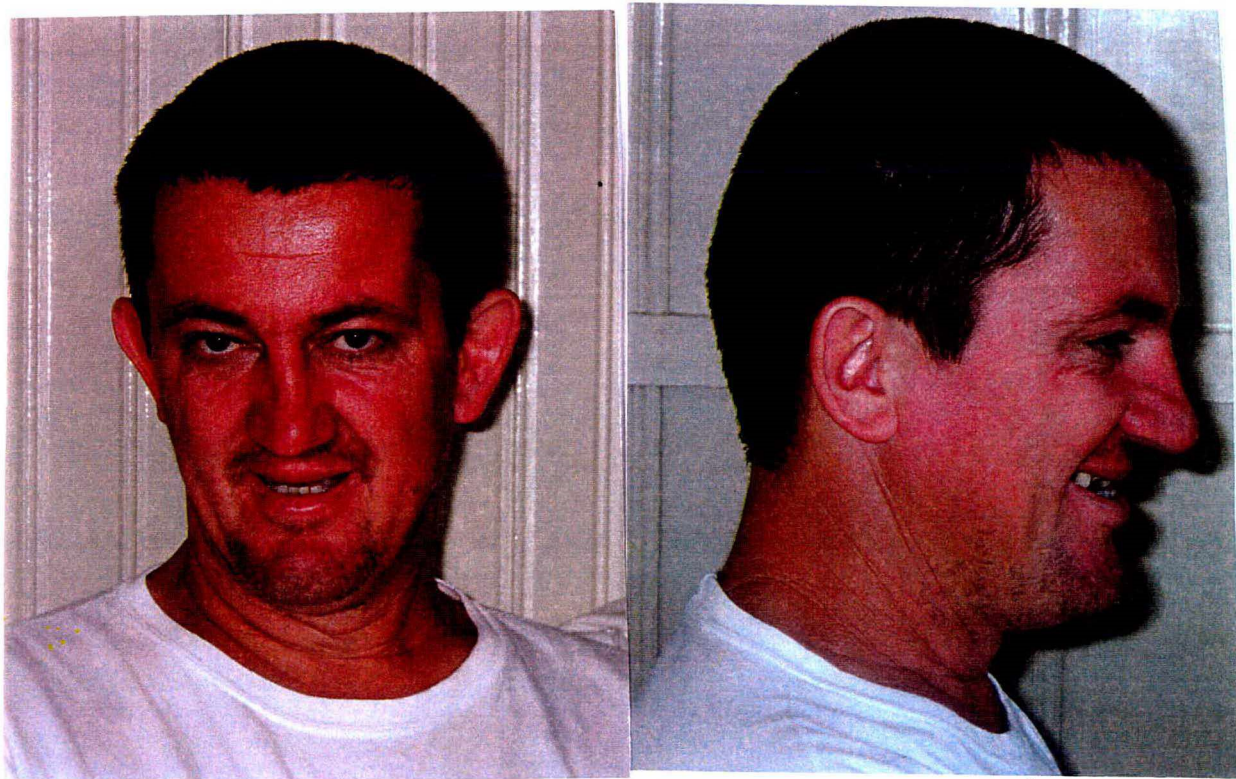


FIGURA 9: O paciente III₁₅

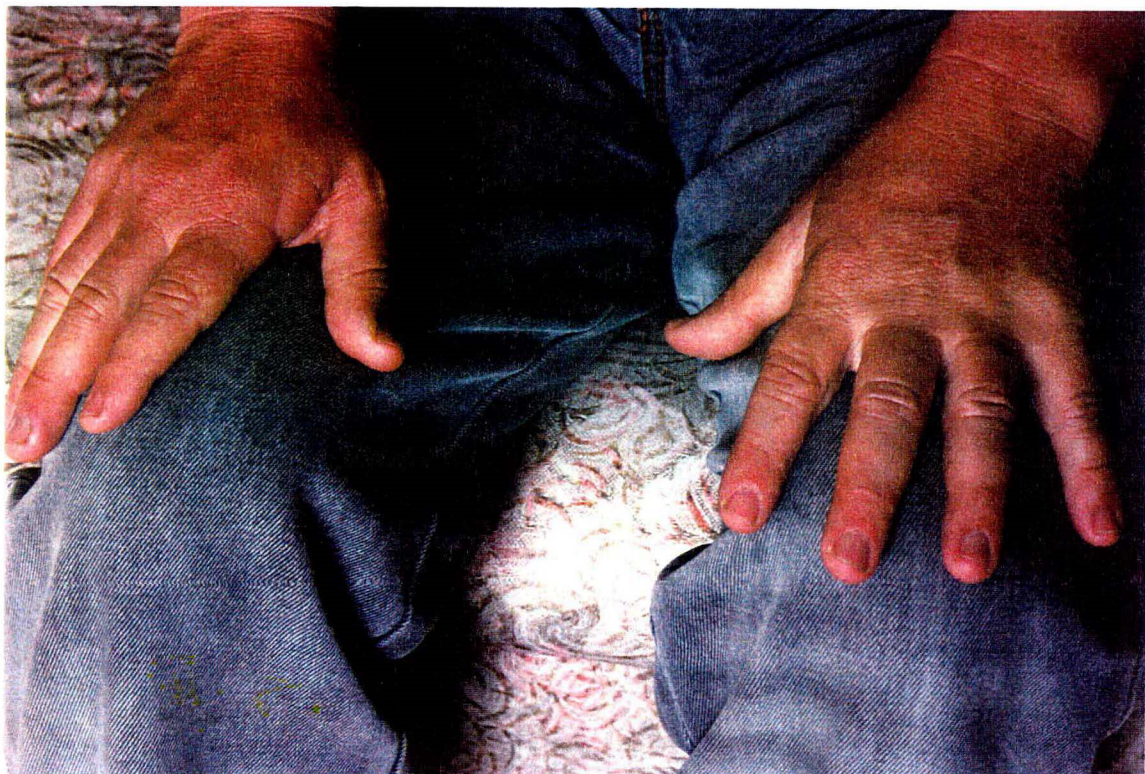


FIGURA 10: Mãos do paciente III₁₅



FIGURA 11: Pés do paciente III₁₅

4.2.4.Paciente III₁₆

M.I.Z., 34 anos em setembro de 1999, feminina, branca, natural de São Pedro de Alcântara (SC), procedente de Florianópolis (SC), sem internações anteriores.(Figuras 12 e 13) Informante: a mesma e a irmã III₁₄. Como queixa principal tinha dificuldade de aprendizagem. Há 25 anos começou a perceber dificuldade de aprendizagem, sendo que não conseguiu passar da 4ª série do primeiro grau. Aos 15 anos de idade procurou escola especial, a qual frequentou por 2 a 3 anos e parou. Retornou aos estudos aos 28 anos, mas sem muitos progressos. A irmã também referia que a paciente apresentava dificuldade de relatar fatos e que era um pouco “brava” -“desde de a época do colégio gostava de brigar”- e tinha grande instabilidade emocional, tendo melhorado bastante ultimamente. Na investigação dos diversos aparelhos e sistemas referia cefaléia esporádica, espirros alérgicos freqüentes e varizes e dores em membros inferiores.

Ao exame físico apresentava:

- Geral: bom estado, hidratada, corada, anictérica, acianótica, eupneica, lúcida, contactuante.
- Segmento cefálico: baixa implantação do cabelo, face estreitada e alongada, pavilhão auricular proeminente com lóbulo saliente, queixo alargado, mandíbula proeminente.
- Tórax: ausculta pulmonar e cardíaca normais.
- Abdome: sem alterações.
- Membros: pulsos palpáveis, boa perfusão. Varizes em membros inferiores bilateralmente.
- Genitália: feminina normal, pêlos pubianos de implantação normal.
- Pele: fina.

- Neurológico: dificuldade de expressão, tímida, instabilidade emocional leve, leve aversão ao contato ocular, reflexos profundos normais.



FIGURA 12: As pacientes III₁₆ e III₁₈



FIGURA 13: A paciente III₁₆

4.2.5. Paciente III₁₈

M.I.Z., 32 anos em setembro de 1999, feminina, branca, natural e procedente de Florianópolis (SC), sem internações anteriores. (Figuras 12 e 14) Informante: a mesma e a irmã III₁₄. A queixa principal era dificuldade de aprendizagem (queixa da irmã). Relatava que ao iniciar o período escolar teve muitas dificuldades, não conseguiu passar da primeira série do primeiro grau e desistiu sem aprender a ler ou escrever. Referia que atualmente administra bem as tarefas domésticas e tem bom relacionamento pessoal. Acreditava que não aprendeu a ler ou escrever por falta de vontade e não por apresentar alguma dificuldade intelectual. Sua gestação foi tranqüila. Nasceu de parto normal, a termo, hospitalar, sem apresentar problemas. No período neonatal não apresentou intercorrências. Andou e falou com 1 ano de idade, seu ganho pondero estatural foi adequado. Os antecedentes patológicos incluíam rubéola, varicela e sarampo antes dos 5 anos e hepatite com 25 anos. Os antecedentes ginecológicos incluíam menarca aos 12 anos e ciclos irregulares com 4 dias de fluxo.

Ao exame físico apresentava:

- Geral: bom estado, hidratada, corada, anictérica, acianótica, eupneica, lúcida, contactuante.
- Segmento cefálico: face estreitada e alongada, pavilhão auricular proeminente com lóbulo saliente, palato ogival.
- Tórax: ausculta pulmonar e cardíaca normais. Mamas sem alterações.
- Abdome: sem alterações.
- Membros: pulsos palpáveis, boa perfusão. Varizes telangiectásicas e estrias em membros inferiores bilateralmente.
- Genitália: feminina normal, pêlos pubianos de implantação normal.

- Pele: fina.
- Neurológico: reflexos profundos normais.



FIGURA 14: A paciente III₁₈

4.3. Análise citogenética

O estudo citogenético foi realizado inicialmente com coloração simples por Giemsa e foram analisadas 100 metáfases de cada indivíduo (Figura 15). Os resultados foram os seguintes:

II₇, II₁₁ e III₁₈ : não foi indentificado o sítio frágil de Xq27.3

III₁₆ : presença de sítio frágil em 2% das metáfases analisadas, confirmado pelo bandeamento GTG

III₄, III₁₀, III₁₁, III₁₅: presença de sítio frágil em mais de 30% das metáfases analisadas, confirmado com bandeamento GTG (Figura 16).

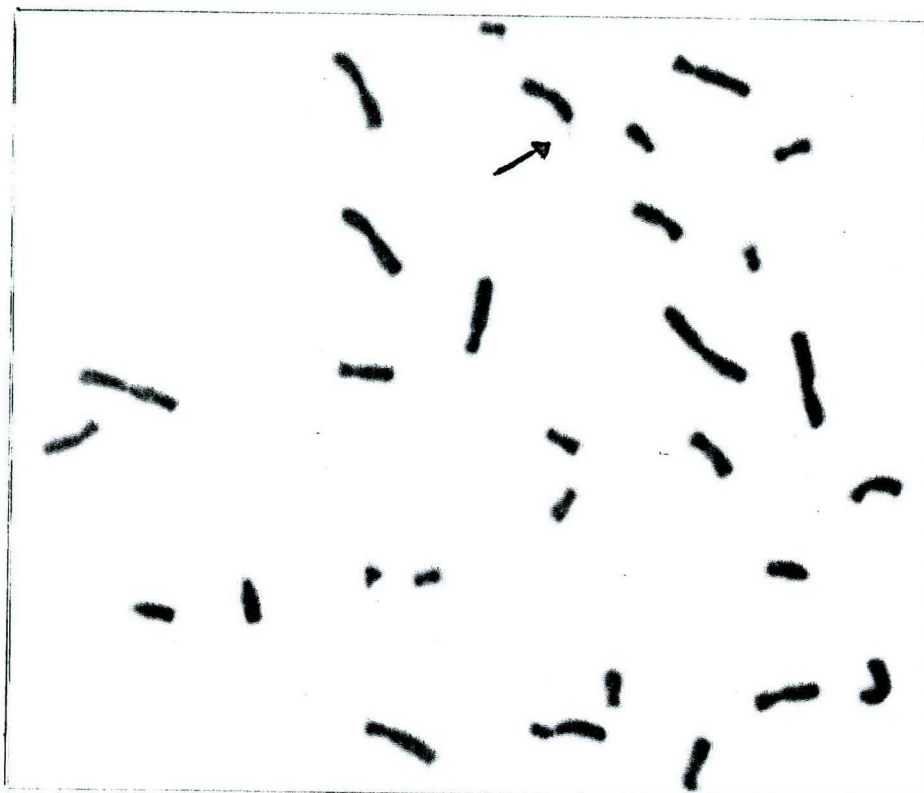


FIGURA 15: Sítio frágil do cromossomo X - coloração convencional

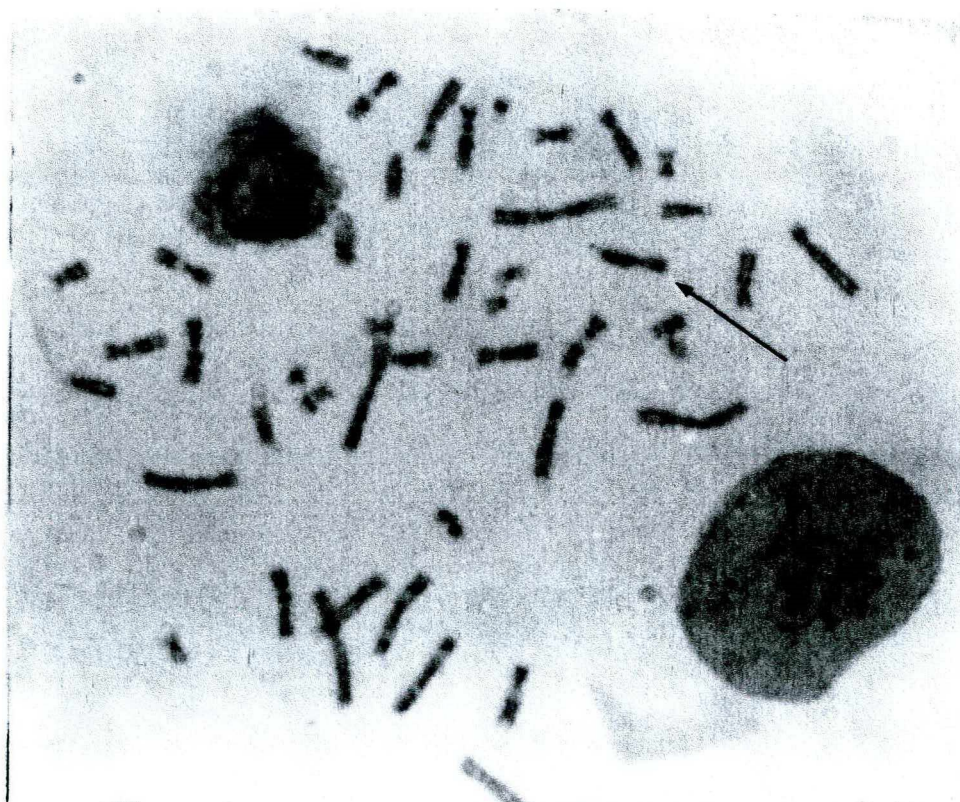


FIGURA 16: Sítio frágil Xq27.3 – bandeamento GTG

4.4. Análise molecular

A análise do DNA foi realizada pela técnica de Southern blot. Para a digestão foi usada a enzima EcoRI, que permite identificar o grau de amplificações no gene FMR1. Os resultados obtidos foram:

- Indivíduo II₁₁ – bandas 5,2 + 5,3 Kb
- Indivíduo II₁₂ – banda 5,2 Kb
- Indivíduo III₁₂ – banda 5,2 Kb
- Indivíduo III₁₄ - banda 5,2 Kb
- Indivíduo III₁₅ – banda 6,4 Kb
- Indivíduo III₁₆ – bandas 5,2 + 5,7 + 6,3 Kb
- Indivíduo III₁₇ – banda 5,2 Kb

Os resultados obtidos com a primeira análise com a enzima EagI deram um sinal autorradiográfico insatisfatório e estão sendo repetidas para o estudo das pacientes II₁₁, III₁₆ e III₁₈.

O estudo molecular dos indivíduos III₁₀, III₁₁ e III₁₈ não foram concluídos para este trabalho.

O estudo molecular foi oferecido também para a mulher II₇, assim como para seus filhos e filhas, porém sem aceitação por medo dos resultados. Contrariamente, a família aqui avaliada, durante todo o trabalho mostrou-se muito interessada, sempre expressando o desejo da realização da análise molecular, que sabiam ser o principal exame diagnóstico.

5.DISSCUSSÃO

A família avaliada neste estudo foi considerada importante porque mostra a segregação de uma forma de deficiência mental ligada ao X, a Síndrome do X Frágil. Esta é uma doença genética que possui uma frequência relativamente alta na população como causa de deficiência mental herdada. Ainda é pouco conhecida no meio médico possivelmente por ser de diagnóstico restrito no Brasil devido a dificuldade de acesso aos métodos laboratoriais.

5.1.Heredograma

Grande número de famílias com FRAXA apresentam uma forma de herança ligada ao X com penetrância incompleta em homens e mulheres. A existência de homens normais transmissores da doença é bastante conhecida, sendo que estes estão restritos as gerações mais velhas da família. Algumas heterozigotas podem apresentar deficiência mental, estas geralmente são filhas de mulheres carreadoras, pois as filhas de homens normais transmissores da doença apesar de serem carreadoras obrigatórias, raramente são afetadas (Sherman et al.²³, Sherman et al.³⁸).

No heredograma (Figura 2) foi observado que quatro homens (III₄, III₁₀, III₁₁ e III₁₅) apresentavam o fenótipo da Síndrome do X Frágil e duas mulheres (III₁₆ e III₁₈) tinham características fenotípicas, incluindo dificuldade de aprendizagem. Todos os indivíduos citados eram irmãos, com exceção do III₄, que era filho de uma tia (II₇), irmã da mãe (II₁₁), dos demais. Assim foi possível

afirmar que estas duas mulheres eram carreadoras obrigatórias da doença mesmo sendo fenotipicamente normais.

Os pais (I_1 e I_2) das carreadoras obrigatórias (II_7 e II_{11}) não foram avaliados porque já eram falecidos, mas possivelmente o pai (I_2) foi o transmissor da síndrome. Isto porque nenhum dos filhos do casal I_1 e I_2 era afetado e não havia história positiva na sua família, tornando improvável a possibilidade da transmissora ter sido a mãe (I_1).

A existência de homens “transmissores” normais já foi relatada por vários estudos^{39,40,41,42}, sendo que Sherman et al.³⁸ demonstraram que as filhas destes homens são normais, mas com filhos (netos dos “transmissores”) afetados, o mesmo que provavelmente ocorreu na família avaliada neste estudo.

5.2. Clínica

5.2.1. Características fenotípicas nos homens

Os três homens afetados que foram examinados, os pacientes III_{10} , III_{11} e III_{15} , apresentavam as três características clássicas da síndrome, o macroorquidismo, com volumes testiculares de 35 ml, 50 ml e 40 ml respectivamente, as orelhas grandes e proeminentes, assim como seus lóbulos e a face longa e estreitada, que segundo Hagerman⁶ estão presentes aproximadamente 80% do total dos casos.

O achado mais comum nos homens afetados após o período puberal é o macroorquidismo, que é encontrado em 70% a 90% dos casos (Nelson)¹³. O

volume testicular considerado normal é de 18 a 25 ml, e deve ser mensurado com um orquidômetro (Hagerman).⁶

A segunda característica citada como clássica, as orelhas grandes e proeminentes que, como já mencionado, estava presente nos três homens afetados, aparece em aproximadamente 50% dos pacientes masculinos afetados. O pavilhão auricular tende a ser muito grande, geralmente maior que 7 cm, com um lóbulo também bastante proeminente. Além disso 30% dos homens com FRAXA podem ter apenas as orelhas proeminentes sem ter seu tamanho aumentado (Hagerman).⁶

A face longa e estreita, que está presente em torno de 60% dos hemizigotos após a puberdade⁶, geralmente possui uma fronte ampla e quadrangular, assim como foi encontrada nos pacientes III₁₀, III₁₁ e III₁₅. Em alguns casos, como observado nos paciente III₁₀ e III₁₅ pode existir também uma proeminência supraorbitária. A base nasal e o queixo alargados, que são muito comuns à síndrome, foram encontrados nos três homens citados acima. A mandíbula durante o decorrer da adolescência vai tornando-se proeminente, levando a formação de prognatismo e à retração da média face, características que só foram observadas no paciente III₁₅. O palato que apresenta-se ogival em 52% dos casos, foi visto nos pacientes III₁₀ e III₁₅ (Vries et al., Gorlin et al.).^{10,14}

A frouxidão ligamentar é uma característica mais comumente observada nos pacientes pré-puberais, sendo que 80% destes apresentam hiperextensibilidade das articulações metacarpofalangeanas (Hagerman)⁶. Esta característica não foi observada nos pacientes avaliados, provavelmente porque todos eram adultos, sendo que nestes a prevalência é de apenas 32%.⁶ Das outras características relacionadas ao comprometimento do tecido conjuntivo, foram encontrados apenas os dedos de mãos e pés grossos e o primeiro pododáctilo alongado. O pé plano, que é descrito estar presente em 40% dos afetados⁶, não foi visto em

nenhum dos pacientes avaliados. Um sopro cardíaco sistólico foi observado no paciente III₁₀, porém sem diagnóstico de prolapso de valva mitral, que é encontrado em 80% dos hemizigotos pós-puberais (Gorlin et al., Hagerman et al.).^{14,15}

5.2.2.Características cognitivas

A principal característica da Síndrome do X Frágil é o retardo mental. Este pode apresentar-se em graus muito variáveis, ocorrendo desde leve até severo comprometimento intelectual. A deficiência mental leve é encontrada em 12% dos pacientes, a severa em 20% e 50% possuem deficiência mental moderada. O restante distribui-se entre deficiência mental profunda e nível intelectual próximo ao normal (Nelson)¹³. Os déficits cognitivos leves são encontrados principalmente nos pacientes mais jovens, ficando a deficiência mental severa mais restrita aos pacientes adultos (Hagerman)⁶. Por causa de dificuldades encontradas, não foi possível avaliar corretamente o quociente de inteligência dos pacientes avaliados neste estudo, mas aparentemente, os três homens examinados (III₁₀, III₁₁ e III₁₅) apresentavam uma deficiência mental moderada.

5.2.3.Características comportamentais

As características comportamentais têm muita importância e podem ser de grande ajuda diagnóstica nos pacientes com X frágil, principalmente nos pré-puberais, onde são mais freqüentemente encontradas e nos quais o fenótipo clínico ainda não está bem estabelecido (Hagerman).⁶

Os distúrbios de comportamento são muito variáveis, ocorrendo desde simples dificuldade de relacionamento até o autismo clássico. Este tem sido muito associado a Síndrome do X Frágil, sendo que Cohen et al.¹⁹ o diagnosticaram em 15% dos pacientes afetados, e em um estudo multicêntrico Blomquist et al.⁴⁰ encontraram o cromossomo X frágil em 16% dos 83 meninos com autismo infantil avaliados.

Os indivíduos afetados geralmente são bastante sociáveis, porém 77% a 90% deles apresentam pobre contato ocular. A hiperatividade também é comum, porém mais freqüente na infância. Os maneirismos de mãos são vistos em 88% dos pacientes, dos quais 66% batem as mãos e 74% as mordem (Hagerman).⁶ Na família avaliada todos os homens afetados apresentavam leve aversão ao contato ocular durante o exame físico. A hiperatividade foi demonstrada somente no paciente III₁₀ e as demais características comuns a síndrome não foram observadas.

Os distúrbios da fala e da linguagem são outros problemas bastante ligados aos indivíduos com X frágil, sendo que os mais comuns são a fala confusa, frases repetitivas e entonação rítmica (Laxova)⁸. Destes a fala confusa foi a única presente nos três pacientes avaliados, a repetição de frases foi observada apenas no paciente III₁₀ e a entonação rítmica não foi encontrada nestes indivíduos.

5.2.4.Heterozigotas

As mulheres afetadas geralmente têm uma apresentação clínica muito menos severa que os homens, e também exibem variação grande no grau de envolvimento fenotípico (Taylor et al.)²⁰. Fryns⁴³ em 1986 relatou características

encontrada é a face longa e estreita com mandíbula proeminente e orelhas grandes e/ou proeminentes. Estas características clínicas foram muito mais comuns em mulheres que apresentavam déficit cognitivo, onde foram observadas em 55% dos casos, que naquelas com inteligência normal, onde apenas 14% apresentavam algum fenótipo da síndrome.

Na família avaliada as pacientes carreadoras que possuíam algum fenótipo da síndrome foram a III₁₆ e a III₁₈.

As duas mostravam a face alongada com orelhas proeminentes. O prognatismo foi notado apenas na primeira, enquanto na paciente III₁₈ foi observado palato ogival, que também pode estar presente, porém menos comumente.

As duas pacientes apresentavam dificuldades de aprendizagem. Entre as heterozigotas a penetrância de deficiência mental estimada é de 30%, e daquelas com inteligência normal em torno de 50% podem apresentar dificuldades de aprendizagem (Sherman et al., Yu et al.).^{23, 44}

Problemas emocionais também têm sido descritos nas mulheres carreadoras do X frágil, não importando o grau de comprometimento cognitivo. As desordens afetivas crônicas têm incidência de 40%, porém os achados mais comuns, e que foram encontrados apenas na paciente III₁₆, são a timidez e o pobre contato ocular (Hagerman).⁶

5.3. Análise citogenética

A característica citogenética da Síndrome do X Frágil é a presença de um sítio frágil na banda Xq27.3 expresso em condições de cultura deficientes em ácido fólico.¹²

O sítio frágil no cromossomo X foi observado como uma constricção no braço longo deste cromossomo durante a metáfase celular (Figuras 15 e 16). A detecção ocorreu mais facilmente com coloração convencional, mas o bandeamento GTG (Figura 16) foi utilizado para confirmação da localização do sítio. Este bandeamento deve ser realizado como rotina para detecção do sítio frágil pois sem ele não se pode afirmar que o sítio observado nas metáfases com coloração convencional é o Xq27.3 (Jacky PB et al.).⁴⁵

O meio utilizado foi acrescido da substância FUdR (inibidor da timidilato sintetase) que diminui a concentração de timidina e é conhecido a muito tempo como um potente indutor de sítios frágeis (Sutherland, Glover et al.).^{12,46}

No estudo citogenético das mulheres II₇ e II₁₁, carreadoras obrigatórias, não foi observada a presença do sítio frágil Xq27.3. A falta de identificação deste pode ser explicado por um efeito da idade das pacientes, ambas com mais de 40 anos, que reduz a chance do X frágil ser encontrado (Sherman et al., Jacobs et al., Chudley et al.).^{23,27,46}

O sítio frágil também não foi identificado nas mulheres III₁₄ e III₁₈, ambas irmãs de homens afetados. A primeira não demonstrava o fenótipo da síndrome e era cognitivamente normal, mesmo assim a certeza de que ela não era carreadora do gene premutado ou mutado só foi obtida com o resultado da análise molecular por Southern. Em relação a segunda apesar do sítio frágil não ter sido identificado, o fenótipo era compatível com a síndrome, incluindo dificuldade de aprendizagem, sugerindo que ela possuía alguma forma de mutação, provavelmente semelhante a de sua irmã III₁₆, porém, a análise molecular não foi concluída a tempo da apresentação deste trabalho. Além disso, segundo Turner et al.⁴⁷, somente 20 a 30% das heterozigotas expressam o X frágil no exame citogenético.

A irmã das mulheres descritas acima, a paciente III₁₆, apresentava o fenótipo da síndrome e demonstrou o sítio frágil Xq27.3 em apenas 2% de suas células no estudo citogenético. Este resultado foi considerado duvidoso e também só a análise molecular por Southern blot foi conclusiva do fenótipo da paciente. Turner et al.⁴⁷ relataram a existência de uma taxa bastante variável, entre 2 e 36%, de cromossomo X frágil nos exames citogenéticos. Neste caso foi considerado que o mosaicismo celular, com premutação e mutação completa, pode ter sido o responsável pela baixa taxa do cromossomo X frágil no estudo citogenético.

Os indivíduos III₄, III₁₀, III₁₁ e III₁₅ apresentaram em mais de 30% de suas metáfases o sítio frágil Xq27.3. Todos eles apresentavam o fenótipo da Síndrome do X Frágil, incluindo retardo mental moderado. Nielsen et al.²⁸ detectaram a expressão do X frágil no exame citogenético de todos os homens afetados. Conforme Turner et al.⁴⁷ e Chudley et al.⁴⁶ apenas 20 a 50% das células dos homens afetados expressam o sítio frágil Xq27.3.

5.4. Análise molecular

A Síndrome do X Frágil é causada por mutações no gene FMR1. A mutação mais comum neste gene é a expansão de uma sequência repetitiva do trinucleotídeo CGG contida na região 5' não traduzida do FMR1 (exon 1), região promotora do gene (Vervek et al.).³

Repetições entre 6 e 54 cópias CGG são tipicamente observadas em indivíduos da população geral (Fu et al.).¹ Quando ocorre expansão e mais de 200 repetições estão presentes, a sequência expandida e uma "ilha CpG" adjacente são normalmente hipermetiladas, um fenômeno associado ao bloqueio da transcrição do gene e normalmente referido como mutação completa do

FMR1 (Vervek et al.).³ Os tamanhos intermediários da repetição (entre 54 e 200 CGGs) referidos como premutação, são caracterizados pela ausência da hipermetilação na região promotora e o fenótipo clínico é normal (Reiss et al., Rousseau et al.).^{50,51}

Para identificar a variação da amplificação da sequência de repetições CGG e o estado de metilação do gene FMR1 nos indivíduos da família avaliada foi realizada análise do DNA pelo método Southern blot com dupla digestão enzimática (EcoRI e EagI) (Figura 3). Porém a digestão pela EagI resultou num sinal autorradiográfico insatisfatório e está sendo repetida para as pacientes II₁₁, III₁₆ e III₁₈. Segundo Rousseau et al.³⁶ este é um método bastante eficiente para a detecção de mutações e de premutações do gene FMR1. A digestão simples pela EcoRI demonstra o tamanho da amplificação da repetição CGG, enquanto a digestão pela EagI detecta o estado de metilação do gene.

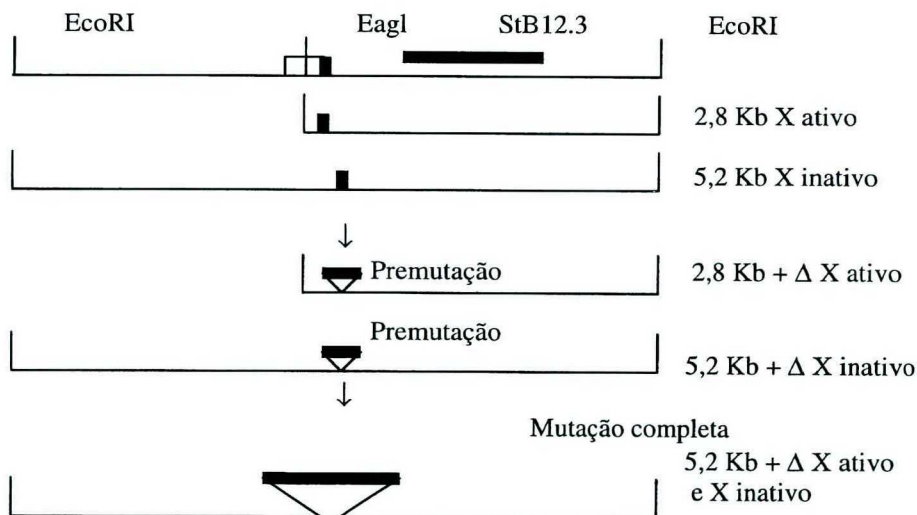


FIGURA 17 - Representação esquemática dos fragmentos de restrição normal e mutado detectados pela sonda StB12.3. (adaptada de Rousseau et al.)³⁶

Na Figura 17 observa-se a localização da sonda StB12.3 e o sítio de restrição da EagI no fragmento EcoRI de 5,2 Kb. Está incluído a seqüência mutável, que aumenta em tamanho com o grau da mutação. Δ representa o aumento no tamanho do fragmento. Os fragmentos da digestão EcoRI-EagI hibridizados pela StB12.3 são mostrados; quando o sítio da EagI está metilado (no cromossomo X inativo em mulheres, ou quando a mutação completa está presente no cromossomo X ativo) é observado um longo fragmento.

TABELA I: Relação entre premutação e mutação do gene FMR1 e metilação no cromossomo X.

GENE FMR1	HOMENS	MULHERES	
	X ativo	X ativo	X inativo
NORMAL	Não metilado	Não metilado	Metilado
PREMUTAÇÃO	Não metilado	Não metilado	Metilado
MUTAÇÃO COMPLETA	Metilação anormal → inibição da transcrição	Metilação anormal → inibição da transcrição	Metilado

A tabela I mostra que a mutação completa do gene FMR1 leva a uma metilação anormal desta região no cromossomo X ativo de homens e mulheres, inibindo a transcrição deste gene. Tal região normalmente só se encontra metilada no cromossomo X inativo das mulheres.

Uma pequena região do DNA no Xq27.3 é anormalmente metilada em pessoas afetadas. Esta região é caracterizada por uma alta densidade de dinucleotídeos de citidina fosfato guanósina (CpG) e pertence a classe de

seqüências regulatórias chamadas “ilhas CpG”. A metilação nestas regiões geralmente inativam a expressão de genes adjacentes. Os fragmentos correspondentes a mutação completa são anormalmente metilados em homens afetados e no cromossomo X ativo das mulheres, enquanto fragmentos correspondentes a premutação ou a seqüência normal são metilados apenas no cromossomo X inativo em mulheres (Tabela I). Portanto o estado de metilação do gene confirma a presença da mutação e o estado funcional do gene FMR1, inativo nos cromossomos X ativos (Rousseau et al.).³⁶

Foram identificados os três diferentes alelos (normal, premutado e mutado) do gene FMR1 entre os pacientes avaliados. Também foi diagnosticado um caso de mosaicismo somático em uma das mulheres.

Os pacientes do sexo masculino, II₁₂, III₁₂ e III₁₇, que eram física e cognitivamente normais, apresentavam na análise molecular um fragmento EcoRI de 5,2 Kb, descrito por Rousseau et al.³⁶ em 1991 como sendo um fragmento de tamanho normal. Também normal, banda de 5,2 Kb, foi o resultado da análise da irmã, III₁₄, que não apresentava fenótipo de FRAXA, desta forma ela não apresenta risco de ter filhos afetados, portanto, a sua filha pode ser considerada normal e também sem riscos de transmitir a doença.

Bandas acima de 5,7 Kb foram encontradas por Rousseau et al.³⁶ na análise de DNA de homens afetados juntamente com a ausência do fragmento normal, representando a mutação completa do gene FMR1. Fragmentos homogêneos entre 5,3 e 5,7 Kb, representando a premutação, foram observados em homens carreadores em substituição à banda normal.

O paciente masculino III₁₅, apresentava uma banda de 6,4 Kb, ou seja, possuía a mutação completa. Este indivíduo apresentava deficiência mental moderada associada a muitas outras características fenotípicas da síndrome. Segundo Rousseau et al.³⁶ 100% dos homens com a mutação completa no gene

FMR1 apresentam deficiência mental pelo menos moderada e segundo Sherman et al.³⁸ estes pacientes geralmente apresentam o fenótipo clínico da síndrome.

Em mulheres carreadoras Rousseau et al.³⁶ descreveram a existência de duas bandas, uma normal, representando o alelo normal, e outra com fragmento da premutação ou da mutação completa.

Um caso muito interessante foi observado na paciente III₁₆ que apresentava três tamanhos diferentes do fragmento EcoRI, um de 5,2 Kb (FMR1 normal), presente no cromossomo X normal, outro de 5,7 Kb (alelo premutado) e um terceiro fragmento de 6,3 Kb (alelo mutado). Isto demonstrou a presença de um mosaicismo somático, ou seja, demonstrou que esta paciente possuía algumas células com um alelo premutado e outras com alelo mutado.

Diversos casos semelhantes já foram descritos na literatura^{7,54}, sendo que Rousseau et al.⁵¹ encontraram alta prevalência de casos de mosaicos entre homens (12%) e mulheres (6%) que carregavam a mutação completa.

Muitos trabalhos já tentaram explicar a origem do mosaicismo somático das repetições CGG. Reyniers et al.⁵⁰ estudando o esperma de quatro homens com X frágil encontraram somente células com a premutação, enquanto que a mutação completa estava presente nos linfócitos do sangue periférico e concluíram que a expansão da premutação para mutação não ocorre na meiose mas num estágio após a formação do zigoto. A mesma conclusão chegaram Kruyer et al.⁵³ após estudo de dois irmãos monozigóticos que tinham números de repetições CGG diferentes. Helderman-van den Eden et al.⁵⁴ também demonstraram diferentes seqüências CGG em dois irmãos monozigóticos, um deles com mosaicismo (premutação + mutação completa), cuja mãe era normal e possuía o alelo premutado. Wohrle et al.⁵⁵ relataram que a expansão acontece precocemente durante a fase embrionária sugerindo que ocorre entre 5 e 20 dias do desenvolvimento, após o início da divisão do zigoto mas antes da diferenciação dos tipos teciduais.

Esta paciente com mosaicismo não tinha deficiência mental, mas apresentava dificuldade de aprendizagem. Vries et al.⁷ não encontraram diferença de capacidade mental significativa entre mulheres que tinham somente mutações completas e aquelas com mosaico, sendo que encontraram algum grau de comprometimento cognitivo em 71% das carreadoras da mutação completa. Taylor et al.²⁰ relataram a presença deste em 65% das heterozigotas com tal mutação, enquanto Rousseau et al.³⁶ o encontraram em 53% destas mulheres.

A filha da paciente III₁₆, IV₁₀, tinha desenvolvimento neuropsicomotor normal para a idade (4 meses, em outubro de 1999). A análise molecular não foi realizada por questões éticas. Tal exame poderá ser realizado em duas condições: se a criança desenvolver dificuldade de aprendizagem durante o desenvolvimento e for necessário descobrir a causa para diagnóstico médico, ou se após os 18 anos ela desejar saber sua condição genética para programação familiar, ou se desejar uma gestação antes desta idade.

A paciente II₁₁, mãe dos indivíduos afetados, apresentava uma banda de 5,2 Kb e outra de 5,3 Kb (alelo premutado). Sua capacidade cognitiva era normal concordando com as observações realizadas por Vries et al.⁷, Taylor et al.²⁰ e Rousseau et al.³⁶, que mostraram ser a capacidade mental das pacientes carreadoras da premutação semelhante a daquelas com o FMR1 normal. A menopausa precoce é associada a mulheres carreadoras da premutação²¹, característica não apresentada por esta paciente (menopausa aos 54 anos).

A premutação da paciente II₁₁ possivelmente foi herdada de seu pai (I₂) (vide discussão do heredograma) e foram expansões desta que originaram as mutações completas encontradas nos filhos e filhas afetados. Segundo Oberle et al.² a expansão da premutação para mutação completa do FMR1 ocorre somente no cromossomo X materno e nunca quando transmitida por um homem “transmissor” normal.

Rousseau et al.³⁶ na prole de mulheres com uma premutação, observaram que das crianças que herdaram o cromossomo X com o alelo premutado, 83% tinham mutação completa e 17% premutação. Em nenhuma geração observaram a ocorrência de expansão de um fragmento normal para mutação completa.

Com estes resultados foi observada a importância da análise molecular por Southern blot nos casos suspeitos de FRAXA. Este exame detecta grandes expansões enquanto a análise por PCR convencional, não é um método eficiente para detecção de grandes expansões, pois não consegue amplificar seqüências com mais de 150 cópias CGGs²⁰. Desta forma, caso tivesse sido usado o PCR convencional no lugar do Southern blot neste estudo, as mutações completas e, portanto, o mosaicismo, não teriam sido diagnosticadas, sendo que este poderia ter sido equivocadamente diagnosticado como uma premutação.

6.CONCLUSÕES

- As características fenotípicas relacionadas a Síndrome do X Frágil mais freqüentes nos homens desta família são: macroorquidismo, face longa e orelhas grandes e proeminentes, associado a deficiência mental moderada, o que corresponde ao fenótipo clássico da síndrome. Entre as mulheres as características são menos severas, ficando restritas a face, associadas a dificuldade de aprendizagem.
- O fenótipo da Síndrome do X Frágil e a expressão do sítio frágil Xq27.3, nos indivíduos analisados, estão relacionados à presença da mutação completa do gene FMR1, sendo que o melhor exame para sua detecção é o Southern blot e análise da metilação.
- Apesar de não ser objetivo deste trabalho é importante relatar o quanto o retardo mental em vários membros de uma família causa ansiedade e temor por uma possível repetição da condição, além de empobrecer materialmente a família. Assim é importante um correto e precoce diagnóstico da Síndrome do X Frágil para a realização de aconselhamento genético e planejamento familiar.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fu YH, Kuhl D, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Oostra AB, et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 1991; 67: 1047-58.
2. Oberlé I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, et al. Mapping a new RFLP marker RN1 (DXS369) close to the fragile site FRAXA on Xq27-q28. *Am J Med Genet* 1991; 38: 332-5.
3. Vervek AJMH, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu Y, Kuhl DPA, Pizzuti A, et al. Identification of a gene (FMR1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in Fragile X syndrome. *Cell* 1991; 65: 905-14.
4. Sutherland GR, Baker E. Characterisation of a new rare fragile site easily confused with the fragile X. *Hum Molec Genet* 1992; 1: 111-3.
5. Hirst MC, Barnicoat A, Flynn G, Wang Q, Daker M, Buckle et al. The identification of a third fragile site, FRAXF, in Xq27-q28 distal both FRAXA and FRAXE. *Hum Molec Genet* 1993; 2: 229-35.
6. Hagerman RJ. Fragile X Syndrome. *Curr Probl Pediatr* 1987; 17(11): 621-74.
7. Vries BBAD, Wiegers AM, Smits APT, Mohkamsing S, Duivenvoorden HJ, Fryns JP, et al. Mental status of females with a FMR1 gene full mutation. *Am J Hum Genet* 1996; 58:1025-32.
8. Laxova R. Fragile X Syndrome. *Adv Pediatr* 1994; 41: 305-41.
9. Chudley AE, Hagerman RJ. Fragile X syndrome. *J Pediatr* 1987; 110(6):821-31.
10. Vries BBAD, Halley DJJ, Oostra BA, Niermeijer MF. The fragile X syndrome. *J Med Genet* 1998; 35:579-89.

11. Jacky P. Fragile X and other heritable fragile sites on human chromosomes. In: Barch MJ, editors. The ACT Cytogenetics Laboratory Manual, 2nd ed. New York: Raven Press; 1991. P.489-523.
12. Sutherland GR. Heritable fragile sites on human chromosomes I. factors affecting expression in lymphocyte culture. *Am J Hum Genet* 1979; 31:125-35.
13. Nelson DL. The fragile X mental retardation syndrome. In: Shaw DJ, editors. *Molecular Genetics of Human Inherited Disease*, 1st ed. Scotland: John Wiley & Sons Ltd; 1995. P.91-114.
14. Gorlin RJ, Cohen MM, Levin JLS. Chromosomal syndromes: Common and/or well- know syndromes. In: *Syndromes of the head and neck*. 3rd ed New York: Oxford; 1990. P.66-8.
15. Hagerman RJ, Van Housen K, Smith ACM, McGavran L. Consideration of connective tissue dysfunction in fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1984; 17: 11-21.
16. Hagerman RJ, Synhorst DP. Mitral prolapse and aortic dilatation in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1984; 17: 123-31.
17. Borghgraef M, Fryns JP, Dielkens A, Van Der Berghe H. Fragile X syndrome: a study of the psychological profile in 23 prepubertal patients. *Clin Genet* 1987; 32: 179-86.
18. Bénézech M, Noël B. Fra (X) syndrome and autism. *Clin Genet* 1985; 28:93.[letter]
19. Cohen IL, Sudhalter V, Pfadt, A, Jenkins EC, Brown WT, Vietze PM. Why are autism and fragile X syndrome associated? Conceptual and methodological issues. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 195-202.
20. Taylor AK, Safanda JF, Fall MZ, Quince C, Lang KA, et al.. Molecular predictors of cognitive involvement in female carriers of fragile X syndrome. *JAMA* 1994; 271(7): 507-14.

21. Murray A, Webb J, Grimley S, Conway G, Jacobs P. Studies of FRAXA and FRAXE in women with premature ovarian failure. *J Med Genet* 1998; 35:637-40.
22. Loesch DZ, Hay DA. Clinical features and reproductive patterns in fragile X female heterozygotes. *J Med Genet* 1988; 25: 407-14.
23. Sherman SL, Morton NE, Jacobs PA, Turner G. The marker (x) syndrome: a cytogenetic and genetic analysis. *Ann Hum Genet* 1984, 48: 21-37.
24. Simonic I, Gericke, GS. The enigma of common fragile sites. *Hum Genet* 1996; 97: 524-31.
25. Sutherland GR. Heritable fragile sites on human chromosomes. VIII Preliminary population cytogenetic data on the folic-acid-sensitive fragile sites. *Am J Hum Genet* 1982; 34: 452-8.
26. Turner G, Till R, Daniel, A. Marker X chromosomes, mental retardation and macro-orquidism. *N Engl J Med* 1978; 28:1472.[letter]
27. Jacobs PA, Glover TW, Mayer M, Fox P, Gerrar, JW, Dunn HG et al.. X-linked mental retardation: a study of 7 families. *Am J Med Genet* 1980; 7: 471-89.
28. Nielsen KB, Tommerup N, Poulsen H, Jacobsen P, Beck B, Mikkelsen M. Carrier detection and X-inactivation studies in the fragile X syndrome. *Hum Genet* 1983; 64:240-5.
29. Eichler EE, Richards S, Gibbs RA, Nelson DL. Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum Molec Genet* 1993; 2: 1147-53.
30. Tarleton JC, Saul RA. Molecular genetic advances in fragile X syndrome. *J Pediatr* 1993; 122 (2):169-85.
31. Brown WT, Houck GE, Jeziorowska A, Levinson FN, Ding X, Dobkin C et al.. Rapid fragile X carrier screening and prenatal diagnosis using a nonradioactive PCR test. *JAMA* 1993; 270(13): 1569-75.

32. Ashley-Koch AE, Robinson H, Glicksman AE, Nolin SL, Schwartz CE, Brown WT, et al.. Examination of factors associated with instability of the FMR1 CGG repeat. *Am J Hum Genet* 1998; 63:776-85.
33. Gronskov K, Hallberg A, Brondum-Nielsen K. Mutational analysis of the FMR1 gene in 118 mentally retarded males suspected of fragile X syndrome: absence of prevalent mutations. *Hum Genet* 1998; 102:440-5.
34. Devys D, Lutz Y, Rouyer N, Bellocq JP, Mandel JL. The FMR1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nature Genet* 1993; 4: 335-40.
35. Sittler A, Devys D, Weber C, Mandel JL. Alternative splicing of exon 14 determines nuclear or cytoplasmic localisation of FMR1 protein isoforms. *Hum Molec Genet* 1996; 5: 95-102.
36. Rousseau F, Heitz D, Biancala V, Blumenfeld S, Kretz C, Boue J et al.. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *New Eng J Med* 1991; 325: 1673-81.
37. Willemsen R, Smits A, Mohkamsing S, Beerendonk HV, Haan AD, Vries BD et al.. Rapid antibody test for diagnosing fragile X syndrome: a validation of technique. *Hum Genet* 1997; 99: 308-11.
38. Sherman SL, Jacobs PA, Morton NE, Froster-Iskenius U, Howard-Peebles PN, Nielsen KB, et al. Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet* 1985; 69: 289-99.
39. Nielsen KB, Tommerup N, Poulsen H, Mikkelsen M. X-linked mental retardation with fragile X. A pedigree showing transmission by apparently unaffected males and partial expression in female carriers. *Hum Genet* 1981; 59: 23-5.
40. Rhoads FA, Oglesby AC, Mayer M, Jacobs PA. Marker X syndrome in an oriental family with a probable transmission by a male. *Am J Med Genet* 1982; 12: 205-17.

41. Webb GC, Rogers JG, Pitt DB, Halliday J, Theobald T. Transmission of fragile (X)(q27) site from a male. *Lancet* 1981; ii:1231-2.
42. Blomquist HK, Bohman M, Edvinsson SO, Gilbert C, Gustavson KH, Holmgren G, et al.. Frequency of the fragile X syndrome in infantile autism: a Suedish multicenter study. *Clin Genet* 1985; 27: 113-7.
43. Fryns JP. The female and the fragile X: a study of 144 obligate female carrier. *Am J Med Genet* 1986; 23: 157-69.
44. Yu S, Mulley J, Loesch D, Turner G, Donnelly A, Hillen D et al.. Fragile-X syndrome: unique genetics of the heritable unstable element. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 968-80.
45. Jacky PB, Ahuja YR, Anyane-Yeboah K. Guidelines for the preparation and analysis of the fragile X chromosome in lymphocytes. *Am J Med Genet* 1991; 38: 400-3.
46. Chudley AE, Knoll J, Gerrard JW, Shepel L, McGahey E, Anderson J. Fragile X-linked mental retardation. I. Relationship between age and intelligence on the frequency of expression of fragile Xq28. *Am J Med Genet* 1983; 14:699-712.
47. Turner G, Brookwell R, Daniel A, Selikowitz M, Zilibowitz M. Heterozygous expression of X-linked mental retardation and X-chromosome marker fra (X)(q27). *N Engl J Med* 1980; 303(12): 662-4.
48. Glover TW. FUDR induction of the fragile site: evidence for the mechanism of folic acid and thymidine inhibition. *Am J Genet* 1981; 33: 234-42.
49. Hagerman RJ, Jackson C, Amiri K, Silverman AC, O'Connor R, Sobesky W. Girls with fragile X syndrome: physical and neurocognitive status and outcome. *Pediatrics* 1992; 89: 395-400.
50. Reiss AL, Freund L, Abrams MT, Boehm C, Kazazian H. Neurobehavioral effects of the fragile X premutation in adult women: a controlled study. *Am j Hum Genet* 1993; 52: 884-94.

51. Rousseau F, Heitz D, Tarleton J, MacPherson J, Malmgren H, Dahl N et al..
A multicenter study on genotype-phenotype correlations in the fragile X
syndrome, using direct diagnosis with probe StB12.3: the first 2.253 cases.
Am J Hum Genet 1994; 55: 225-37.
52. Reyniers E, Vits L, De Boulle K, Van roy B, Van Velzen D, de Graff E et
al.. The full mutation in the FMR1 gene of male fragile X patients is absent
in their sperm. *Nature Genet* 1993; 4: 143-8.
53. Kruyer H, Mila M, Glover G, Carbonell P, Ballesta F, Estivill X. Fragile X
syndrome and the (CGG)_n mutation: two families with discordant MZ twins.
Am J Hum Genet 1994; 54: 437-42.
54. Helderma-van den Enden ATJM, Maaswinkel-Mooji PD, Hoogendoorn E,
Willemsen R, Maat-Kievit JA, Losekoot M, Oostra BA> Monozygotic twin
brothers with the fragile X syndrome: different CGG repeats and different
mental capacities. *J Med Genet* 1999; 36: 253-7.
55. Wohrle D, Henning I, Vogel W, Steinbach P. Mitotic stability of fragile X
mutations in differentiated cells indicates early post-conceptual trinucleotide
repeat expansion. *Nature Genet* 1993; 4: 140-2.

8.RESUMO

A Síndrome do X Frágil ou FRAXA é caracterizada por deficiência mental, macroorquidismo, face longa, orelhas grandes e proeminentes. É associada ao sítio frágil folato sensível Xq27.3, onde está localizado o gene FMR1 que apresenta uma seqüência repetitiva do trinucleotídeo CGG, cuja expansão é a base da doença. Objetivando demonstrar, numa família, a expressão fenotípica da FRAXA e a expansão da repetição CGG correlacionada com achados clínicos e citogenéticos, foi realizada avaliação clínica, citogenética e análise molecular por Southern blot. Foi observado que os homens afetados apresentavam as características típicas da síndrome citadas acima, entre outras, enquanto as mulheres tinham características de face associadas a dificuldade de aprendizagem. No estudo citogenético o sítio frágil Xq27.3 foi detectado apenas nos homens afetados e em 2% das células de uma das mulheres com fenótipo, sendo, para estas, insuficiente como teste diagnóstico. Apenas a análise molecular por Southern blot determinou quais mulheres possuíam mutação ou premutação e tinham risco de terem filhos afetados. Na mãe, clinicamente normal, foi observada a premutação. A análise também foi realizada em 3 de seus filhos e duas das filhas. Dois filhos e uma filha foram normais. Um dos filhos com fenótipo tinha mutação completa. Uma das filhas, com dificuldade de aprendizagem, apresentava mosaïcismo somático (mutação + premutação). Observa-se portanto, que o fenótipo da síndrome e a expressão do sítio frágil Xq27.3, nos indivíduos analisados, são relacionados à presença da mutação completa do FMR1, sendo o melhor exame para sua detecção o Southern blot e análise da metilação.

9. SUMMARY

The Fragile X Syndrome or FRAXA is characterized by mental impaired, macro-orchidism, long face and protruding ears. It is associated with the folate sensitive site Xq27.3, which locates the FMR1 gene that has a repetitive sequence of the trinucleotide CGG, whose expansion is the syndrome's basis. With the objective of showing, in a family, the phenotypic expression of FRAXA and the expansion of the CGG repeat correlated with clinical and cytogenetics finds, clinical and cytogenetic evaluation and molecular analysis by Southern blot were made. It was observed that the affected males showed the syndrome's features cited above, among others, while the females had some face phenotype associated with learning disabilities. In the cytogenetic study the fragile site Xq27.3 was detected in the affected males and in 2% of the cells of one of the females with phenotype, being, for these females, insufficient as a diagnosis test. Only the molecular analysis by Southern blot showed which female had mutation or premutation and had risks of having affected sons. In the mother, clinically normal, premutation was observed. The analysis was also made in 3 of her sons and 2 of her daughters. Two sons and one daughter were normal. A son with phenotype had complete mutation. A daughter showed somatic mosaicism (mutation + premutation). Therefore it is observed that the syndrome's phenotype and the expression of the fragile site Xq27.3, in the analyzed individuals, are related to the presence of the complete mutation of the FMR1, being the Southern blot and the methylation analysis the best exam to detect it.

10.APÊNDICE

Exame clínico – características sugestivas de FRAXA

NOME: _____

FACE	
Face longa	
Fronte ampla	
Proeminência supraorbitária	
Distância intercantal ↓	
Queixo alargado	
Mandíbula proeminente	
Palato ogival	
Pav. auricular > 7 cm	
Lóbulo da orelha proeminente	
Retração da média face	
Nariz com base alargada	

COGNIÇÃO + COMPORTAMENTO	
Deficiência mental	
Fala demorada	
Fala embaralhada	
Entonação rítmica	
Frases repetitivas	
Retardo desenv. motor	
Hiperatividade	
Hipotonia leve	
Reflexos tendinosos ↑	
Automutilação	
Instabilidade emocional	
Pobre contato ocular	

TECIDO CONJUNTIVO	
Lassidão ligamentar	
Pele fina	
Pé plano	
Quirodáctilos grossos	
Pododáctilos grossos	
1º pododáctilo longo	
Estrabismo	
Prolapso de valva mitral	
Dilatação aórtica	

	GENITOURINÁRIO	
Homem	Macrorquidismo	
	Consistência testicular ↓	
	Hiperpigmentação escroto	
	↑ peniano	
Mulher	↑ da fertilidade	
	↑ da gemelaridade	
	↑ abortos	
	Menopausa precoce	

**TCC
UFSC
CM
0426**

Ex.1

N.Cham. TCC UFSC CM 0426

Autor: Lora, Fabiana Ligi

Título: Estudo clínico, citogenético e m



972808178

Ac. 253575

Ex.1 UFSC BSCCSM